

細胞診断におけるセルブロックの活用

京都第二赤十字病院 検査部

真下 照子 井上 慶一 北野 宏
丹治 義明

京都第二赤十字病院 病理診断科

山野 剛 桂 奏

要旨：体腔液および体腔洗浄液（以下体腔液）細胞診断の主たる目的は、腫瘍細胞の有無の判定であるが、細胞所見のみでは腫瘍細胞と反応性中皮細胞との鑑別に苦慮することがある。また腫瘍細胞の出現を確認できても、組織型や原発巣の確定に至らないことも多い。セルブロックを作成することにより、多種類の免疫染色が施行でき、細胞の由来、腫瘍細胞の組織型、原発巣の確定が可能となった。また、分子標的治療薬の進歩に伴い、薬剤投与適否判断のための遺伝子変異解析や発現タンパク検出の必要性が増えつつあるが、セルブロック材料はこれらにも用いることができる。

Key words：体腔液、セルブロック、細胞診断、免疫染色、遺伝子変異解析

1. はじめに

当病理検査室では、従来体腔液の細胞診断に際し、パパニコロー染色とギムザ染色、PAS 染色、Al-Blue 染色を行い、残りの検体は4～5日間冷蔵保存した後、破棄していた。免疫染色などの追加染色が必要なときは、パパニコロー標本を脱色し行っていたが、施行できる免疫染色の数は限られていた。そこで、2012年から可能な限り残検体をホルマリン固定し、2013年からは良悪鑑別困難以上の判定であればセルブロックを作成し、保存するようにしている。セルブロックを作成することにより、後日、多数の免疫染色や遺伝子変異解析検査が可能となった。いくつかの症例を提示し、セルブロック作成の有用性について報告する。

2. 対象症例

細胞診断の判定は、「陰性」「良悪鑑別困難」「悪性疑い」「悪性」の4段階で評価している。パパニコロー染色、PAS 染色、Al-Blue 染色、ギムザ染色にて判定を行い、「良悪鑑別困難」「悪性疑い」「悪性」と判定した検体をセルブロックにしている。当院での体腔液細胞診断の件数は、2012

年1月から2014年9月の2年9か月間で886例あり、セルブロックを作成した症例数は108例であった。免疫染色を行ったのは20例で、うち反応性中皮細胞との鑑別目的が6例、組織型および原発巣の推定目的が14例であった。また、5例で分子標的薬適否判断のため遺伝子変異解析検査および、発現タンパクの検出が行われた。

3. セルブロック作成方法

セルブロックの作成方法は、遠心分離収集法（コロジオバック法、クライオバイアルを用いる方法など）や細胞固合法（試薬の凝固作用を利用する方法）などいくつかある⁴⁾が、当院では細胞固合法のひとつである海藻成分のアルギン酸を用いて作成している（図1）。

- ①体腔液を遠心分離し、沈渣をポリの試験管に入れ、ホルマリン3 mlを加え混和する。
- ②室温で3時間以上固定後、3000 rpm 5分、遠心分離を行う。（図1-a）
- ③上清を捨て、沈渣に1% アルギン酸 Na を0.5～1 ml 加え、混和する。
- ④遠心分離を行い、上清を捨てる。
- ⑤沈渣に1 M 塩化カルシウム 100 μ l を静かに加える。

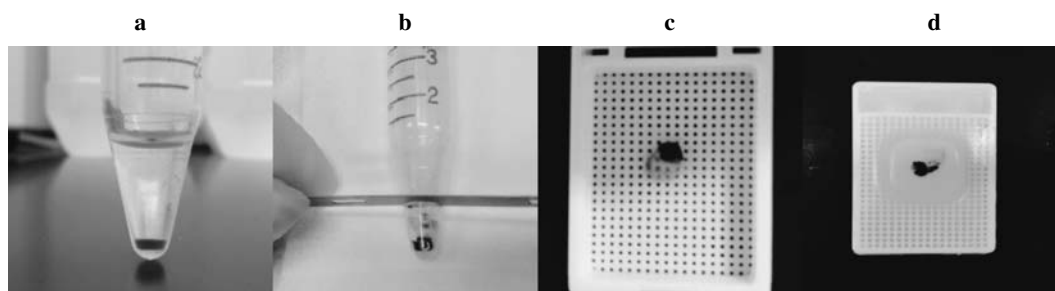


図1 セルブロック作成過程

- a: 室温固定後遠心分離
b: 試験管の上部をナイフで切り取る
c: ゲル状になった沈渣をカセットに入れる
d: 完成したパラフィンブロック

- ⑥しばらくするとゲル状に固まる。
⑦試験管の上部をナイフで切り取り、ゲル状になった沈渣を取り出す。(図1-b)
⑧カセットに入れ、自動包埋装置にセットし、翌朝パラフィンブロックを作成する。(図1-c, d)

4. 症 例

【症例1】70歳代女性。乳癌、糖尿病の既往あり。腹痛のため当院消化器科を受診し、胃内視鏡と生検にて早期胃癌（低分化腺癌）と診断された。2か月後に幽門側胃切除術が施行され、手術終了時に腹腔洗浄液が提出された。腹腔洗浄液中には、配列不整な上皮様乳頭状集塊を多数認めた。集塊の細胞密度は高く、核の腫大や大小不同、明瞭な核小体を認め、腺癌の播種を疑った（図2-a）。切除された胃には不規則な索状構造を示す低分化腺癌を認めたが、粘膜内癌であった。しかし、病変中心部の漿膜下層や漿膜表面に、上皮様配列を示す細胞集塊が散在性に認められた（図2-d）。免疫染色を行った結果、腺癌で陽性となるCEAに染まらず、中皮細胞で陽性となるCalretininに染まり（図2-e）、癌の浸潤ではなく反応性中皮細胞と考えられた（表1）。腹腔洗浄液中に出現していた異型細胞はこれらの細胞と類似していたため、セルブロックを用い免疫染色を行った。その結果、腺癌細胞を疑った細胞は、CEA陰性、Calretinin, D2-40, EMAがいずれも陽性で（図2-b, c）、反応性中皮細胞と判断した（表1）。現在、外来にて定期フォローされており、再発はみられない。

【症例2】70歳代男性。膀胱癌の手術歴あり。呼

表1 中皮細胞と腺癌細胞との鑑別に有用な抗体
(当院で染色可能な抗体)

	陽性を示す抗体
中皮細胞	Calretinin, D2-40, Cytokeratin 5/6
腺癌	CEA, BerEP4, CA19-9
共通	Cytokeratin (AE1 + AE3), EMA

体腔液細胞診アトラス¹⁾、免疫組織化学と in situ hybridization のすべて³⁾より引用

吸苦があり、胸部CT検査にて両側胸水および右に肺塞栓を認めたが、明らかな肺転移、縦隔リンパ節腫脹は認められなかった。胸水中には核の腫大した異型細胞が孤立散在性、または集簇状に多数出現していた。細胞は結合性が弱く、核は中心性で大小不同や核縁の切れ込み、クロマチンの顆粒状増量を認めた（図3-a）。多核細胞も散見され癌の播種と考えた。細胞所見のみからは組織型の推定は困難であり、セルブロックを用いた免疫染色を行った。その結果、異型細胞は、Cytokeratin (CK)7とCK20がいずれも陽性で（図3-b, c, d）、肺腺癌で高頻度に陽性となるTTF-1は陰性であった。以前に切除された膀胱癌と同様の染色パターンで、膀胱の尿路上皮癌（移行上皮癌）の播種と考えた（表2, 3）。その後、化学療法が施行されたが、薬剤性間質性肺炎を発症し、化学療法は中止となり、発症後約5か月で永眠された。

【症例3】60歳代男性。咽頭癌の既往あり。右側腹部痛があり、消化器科受診。超音波検査で肝臓に10mm程度の占拠性病変を認め、腹部造影CTを施行。右肺胸水と右肺S1に占拠性病変を認め、癌性胸膜炎疑いのため、右胸水細胞診断が行

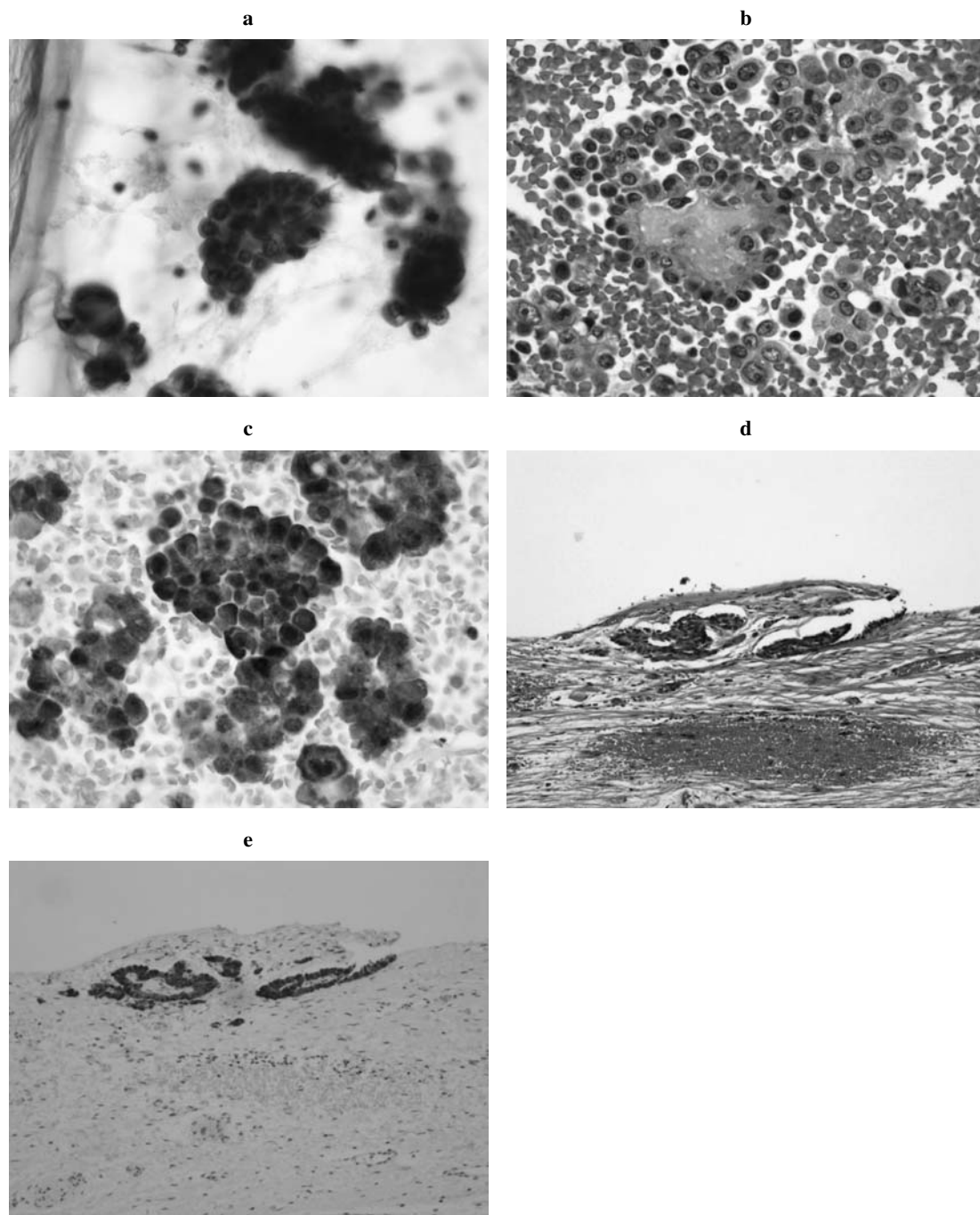


図 2 症例 1

- a: 腹腔洗浄の細胞所見パニコー染色
 b: セルブロック HE 染色
 c: セルブロック Calretinin 染色
 d: 手術材料 HE 染色
 e: 手術材料 Calretinin 染色

われた。胸水中には、淡い細胞質と大小不同の腫大核を有する異型細胞が、不規則乳頭状に多数出現していた（図 4-a）。明瞭な核小体とクロマチン増量を認め腺癌の播種と考えたが、咽頭扁平上皮癌の既往があるため、セルブロックを用い免疫

染色を行った。その結果、CK7 陽性、CK20 陰性、TTF-1 陽性（図 4-b）であり、肺癌の播種と考えた（表 2, 3）。この症例では、分子標的薬の適否判定のため、セルブロックを用いて EGFR 遺伝子変異解析が行われ、変異が検出されたため

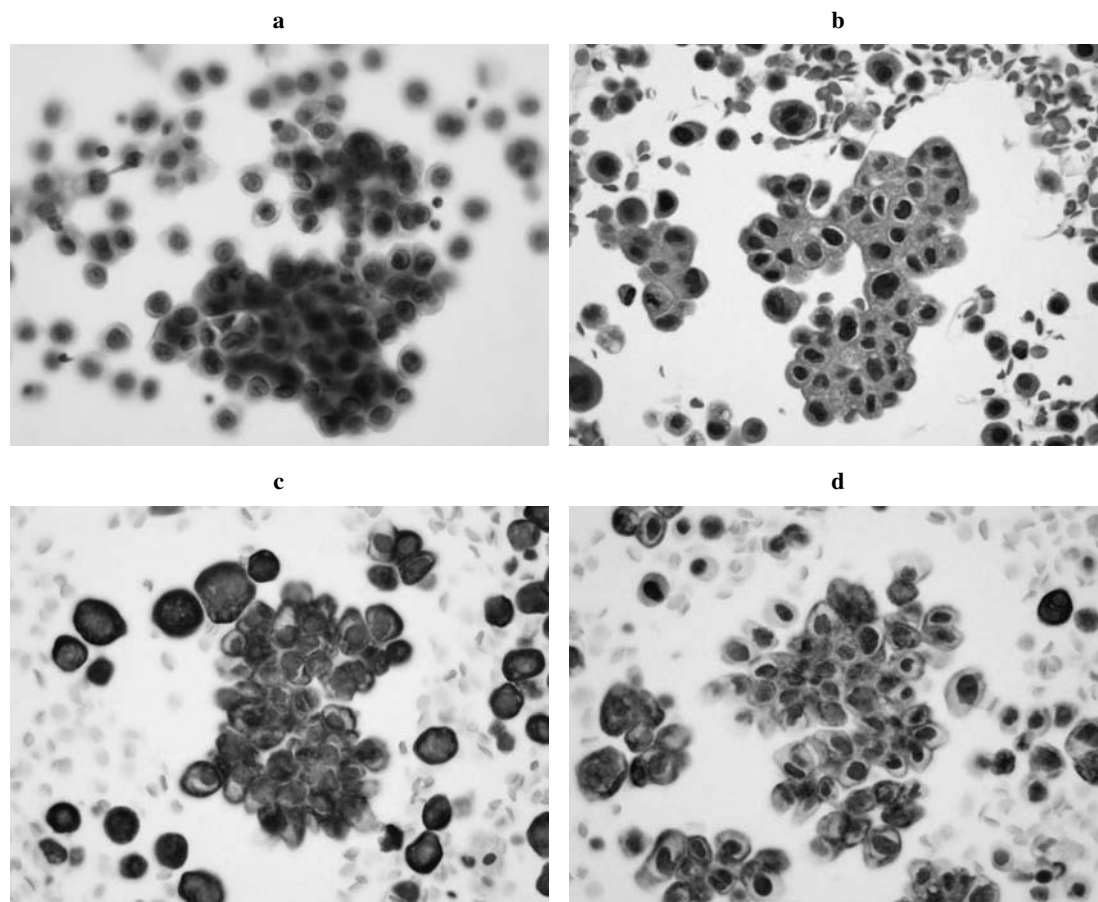


図3 症例2

- a: 胸水の細胞所見パパニコロー染色
 b: セルブロック HE 染色
 c: Cytokeratin 7 染色
 d: Cytokeratin 20 染色

表2 Cytokeratin (CK) 7, CK20 の免疫染色パターンによる原発巣の推定

	CK7 陽性	CK7 陰性
CK 20 陽性	胃癌の一部, 膵臓癌・胆道癌 尿路上皮癌, 卵巣粘液癌	胃癌の一部, (十二指腸癌) 大腸癌
CK 20 陰性	消化管以外の多くの腺癌 (肺腺癌, 乳癌, 卵巣非粘液性癌) 悪性中皮腫, 甲状腺癌, 唾液腺癌	肝細胞癌, 腎癌, 前立腺癌 扁平上皮癌 小細胞癌

体腔液細胞診アトラス¹⁾, 免疫組織化学と in situ hybridization のすべて³⁾より引用

表3 原発巣を推定しうる抗体

TTF-1	肺腺癌, 甲状腺癌
PSA	前立腺癌

体腔液細胞診アトラス¹⁾より引用

適応となった。

【症例4】70歳男性。早期胃癌、左腎尿管癌の既往あり。2013年5月左腎尿管全摘術後のフォロー

一中、2014年2月、著明な心嚢液貯留を認めた。原因検索のため細胞診断を行った。心嚢液中には、N/C比の高い異型細胞が孤立散在性に多数出現していた。核縁の不整があり、明瞭な核小体も認めた(図5-a, b)。悪性リンパ腫が考えられ、確定のためセルブロックを用い、免疫染色を行った。その結果、CK陰性、CD20陽性で瀰漫性大細胞型B細胞性リンパ腫と診断された(図5-c,

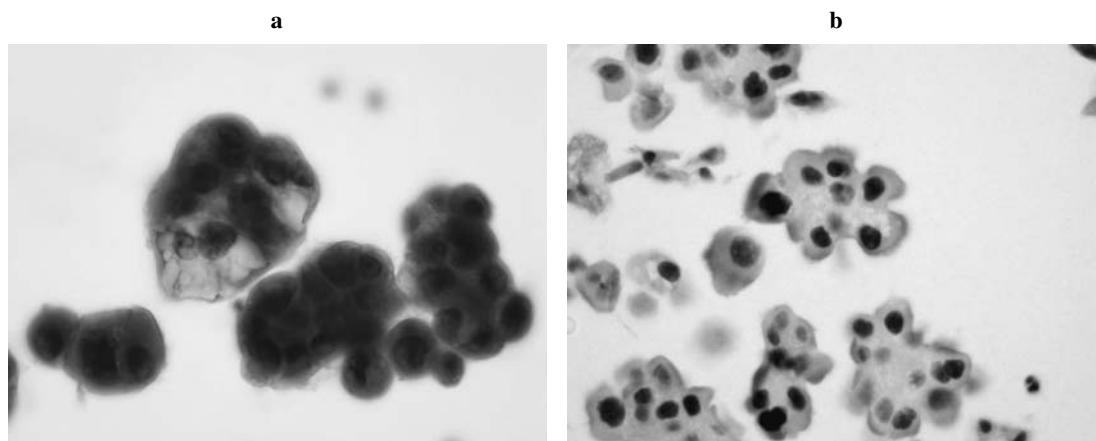


図 4 症例 3

a : 胸水の細胞所見パパニコロー染色
b : TTF-1 染色

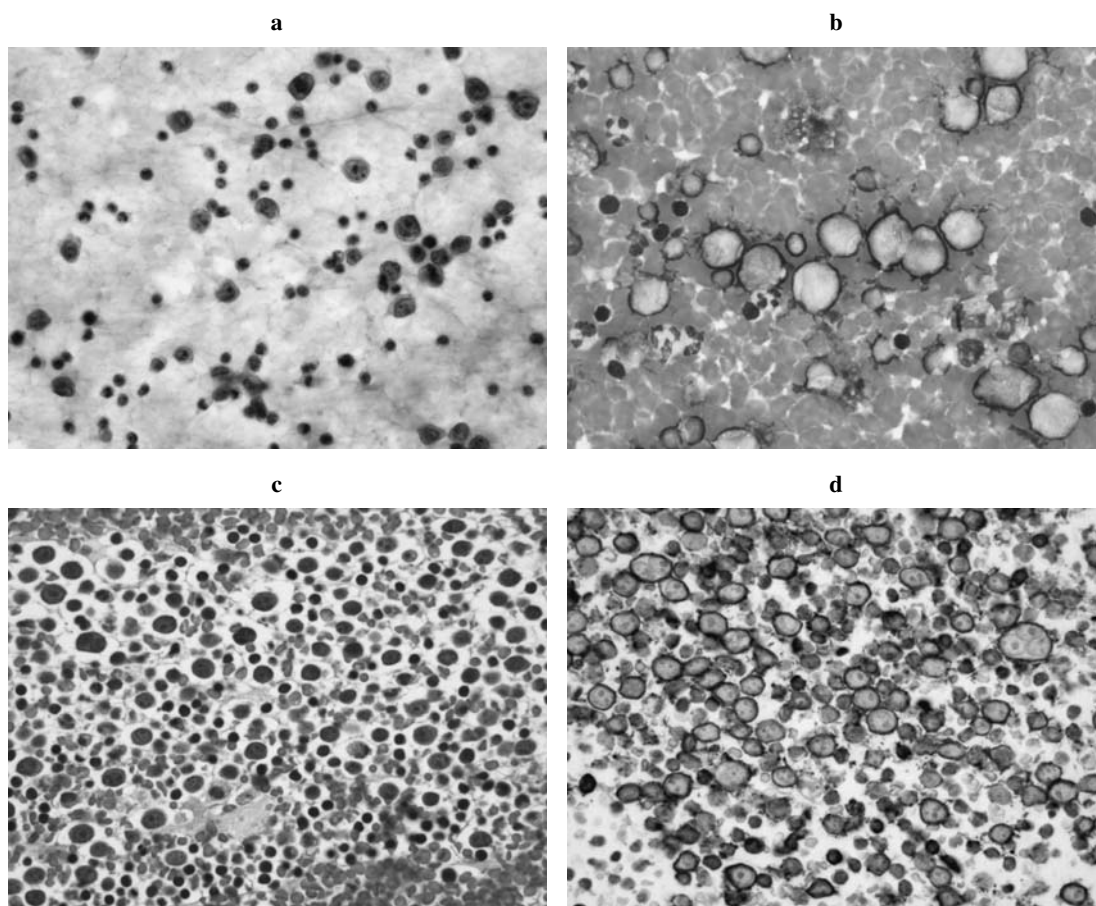


図 5 症例 4

a : 心嚢液の細胞所見パパニコロー染色
b : ギムザ染色
c : セルブロック HE 染色
d : CD20 染色

d). 化学療法施行後、現在、再発は認められていない。

5. 考 察

体腔液の細胞診断の主たる目的は、腫瘍細胞が存在するか否かである。体腔液への播種の有無は予後因子の一つであり治療方針決定の要因となる。また体腔液の細胞は、組織診断による裏づけが得られず細胞診断が唯一の診断材料となる場合が多いため、重要度が高い。しかし、体腔液中の腫瘍細胞は時として反応性中皮細胞との鑑別が難しく、また腫瘍細胞の播種と確定できても組織型や原発巣の確定に至らないことがある。そのような時、多種類の免疫染色や特殊染色を行えるセルブロックの作成が必要となってくる。

症例1は、反応性中皮細胞との鑑別目的で免疫染色を施行した一例である。体腔液への播種は腺癌細胞が最も高頻度に出現しうる腫瘍細胞といわれている^{1,2)}。腺癌細胞は不規則な重積性を示す乳頭状や球状集塊として出現することが多く、細胞質は淡く核は偏在傾向を示し、核形不整や大型明瞭な核小体が見られ、核クロマチンは増量し不均等に分布する、などの所見を有するが、胃腺癌や肺腺癌の一部で孤立散在性に出現したり、重厚感のある細胞質や中心性核など、中皮細胞様の所見を呈することがある。また反応性中皮細胞は不規則重積性に出現し明瞭な核小体を持つこともあり、腺癌細胞との鑑別は時に困難である^{1,2)}が、表1のようにいくつかのマーカーを染めることにより、両者の鑑別が可能である。症例2・3・4は、いずれも複数の悪性腫瘍の既往のある患者で、体腔液細胞診断で腫瘍細胞を認め、腫瘍細胞の組織型と原発巣確定のため免疫染色を施行した症例である。体腔液中の細胞および細胞集塊は球

体化傾向を起こしやすく、また細胞質に変性所見を呈することが多いため、組織検体と単純に比較できない。特に肺では原発だけでなく転移性腫瘍の頻度が高いため、胸水中の悪性腫瘍の鑑別は難しい。セルブロックは、組織検体と同時に免疫染色を行う事もできるため、原発巣の確定も可能である。症例3では、セルブロックを用い遺伝子変異解析まで検査を行うことができ、分子標的薬が適応された。本症例を含め、分子標的薬の適否判断のための遺伝子変異解析や発現タンパク検出は5例であったが、今後分子標的治療の進歩に伴い、その適否判断を目的としたセルブロック作成の機会が増えていくと思われる。

6. 結 語

体腔液細胞診断では、腫瘍細胞の有無を証明するのみでなく、治療の進歩に伴い、原発巣や組織型の確定を要求されることが多くなっている。セルブロックを作成することにより、免疫染色や遺伝子変異解析が可能となり、治療方針決定の一助になると考える。

参 考 文 献

- 1) 亀井敏昭. 体腔液に出現する細胞の形態とマーカー. 海老原善郎, 亀井敏昭. 体腔液細胞診アトラス. 1. 東京: 篠原出版, 2002: 31-44
- 2) 古田則行. 体腔液・脳髄液の細胞診. 坂本穆彦. 細胞診を学ぶ人のために. 5. 東京: 医学書院, 2013: 278-293
- 3) 伊藤仁, 宮嶋葉子, 長村義之. 細胞診への応用. 長村義之, 他. 免疫組織化学と in situ hybridization のすべて. 1. 東京: 文光堂, 2000: 208-211
- 4) 細胞診標本作成マニュアル (体腔液). 1.2008. 細胞検査士会編